

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292065

研究課題名(和文) 腸管免疫細胞の新規相互作用の解明に基づく食品による免疫調節

研究課題名(英文) Immunomodulation by foods based on elucidation of novel interactions of intestinal immune cells

研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA, Satoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40238019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、免疫機能食品への応用をめざし、腸管免疫応答における新規細胞間相互作用、およびそれに対する腸内共生菌、食品成分による制御を明らかにすることを目的とした。まず、高い制御性T細胞誘導能を有するマウス腸間膜リンパ節樹状細胞のサブセットについて解析し、また食物アレルギーの抑制機構である経口免疫寛容において誘導される2種類の制御性T細胞群のDNAマイクロアレイ解析を行った。さらに、樹状細胞、T細胞、B細胞の共培養系を用いて、食品として利用される乳酸菌体による、濾胞性ヘルパーT細胞の誘導促進機構について解析した。また、腸管免疫系における自然リンパ球の腸内細菌菌体刺激に対する応答性も解析した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate novel interactions of intestinal immune cells to develop immunomodulating functional foods. We firstly examined the dendritic cell subset of mouse mesenteric lymph node with high regulatory T cell inducing function. Then, we examined the gene expression profiles of two regulatory T cell populations induced in oral tolerance by DNA microarray. Furthermore, the mechanism of induction of T follicular helper cells by lactic acid bacteria for food was examined in an in vitro culture with dendritic cells, T cells and B cells. Finally the responses of innate lymphoid cells of gut-associated lymphoid to intestinal bacteria were examined.

研究分野：食品免疫学

キーワード：食品 食品機能 食品免疫 腸管免疫 制御性T細胞 樹状細胞 乳酸菌 濾胞性T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食品成分が免疫系に作用することが示され、これらを利用した新規機能性食品の開発が進められている。腸管には最大級の免疫系が存在し、食品成分の作用を受けるのはこの腸管免疫系である。この腸管免疫応答において、腸管独特の免疫細胞が関与することが明らかになっており、この中で、今まで解明されていなかった新規の細胞間の相互作用が明らかになりつつある。これらの新規細胞間相互作用は、腸内共生菌、食品成分による制御を受けると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、腸管免疫応答における新規細胞間相互作用、およびそれに対する腸内共生菌、食品成分による制御を明らかにし、免疫機能食品開発へ応用をめざすものである。我々はこれまでに (1) 感染防御や腸内共生菌を担う IgA 抗体産生、および食物アレルギーの抑制機構である「経口免疫寛容」それぞれに重要な腸管樹状細胞 (2) 経口免疫寛容に関わる制御性 T 細胞 (3) IgA 産生誘導などに関係する腸管の自然リンパ球等の腸管免疫系に特徴的な免疫細胞を研究対象として新知見を得てきた。本研究では、腸管免疫系の細胞群の新規相互作用を解明、これら細胞の腸内共生細菌、食品因子に対する応答性について検討し、腸管免疫細胞の相互作用を新たな作用点とした新規免疫機能食品の開発につながる基盤研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸間膜リンパ節樹状細胞による制御性 T 細胞誘導の解析

BALB/c マウスの腸間膜リンパ節細胞から CD11c<sup>+</sup> 細胞として樹状細胞を分離し、CD11b, CD103, PD-L1 の発現により規定される各樹状細胞サブセットの細胞表面分子発現をフローサイトメーターにより解析した。また、蛍光セルソーターを用いて、各樹状細胞サブセットを精製した。

精製された腸間膜リンパ節樹状細胞各サブセットの細胞を、卵白アルブミン(OVA) 特異的 T 細胞抗原レセプター (TCR) を発現する D011.10 TCR トランスジェニックマウス由来脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞と OVA 抗原ペプチド存在下培養した。その後、CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞内 Foxp3 をフローサイトメーターにて解析することにより、制御性 T 細胞の誘導を解析した。また、本培養系に抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体を添加して影響をみた。

また、OVA を飲水に添加して投与した BALB/c マウス腸間膜リンパ節から各樹状細胞サブセットを精製し、in vitro において、D011.10 TCR トランスジェニックマウス CD4<sup>+</sup>T 細胞と培養することにより、in vivo で取り込んだ抗原の抗原提示能を評価した。

#### (2) 経口免疫寛容における制御性 T 細胞

#### の解析

D011.10 TCR トランスジェニックマウスにおいて、OVA 含有水の摂取により経口免疫寛容が誘導される。本マウスに OVA を経口摂取させ、CD62L<sup>high/int</sup>CD44<sup>int</sup>T 細胞と CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>T 細胞を蛍光セルソーターにより精製し、これら 2 種類の制御性 T 細胞、および未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより検討した。

また、卵白食を摂取させることによりアレルギー症状を呈する OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである RAG2<sup>-/-</sup>OVA23-3 マウス由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗原提示細胞存在下様々な濃度の OVA にて抗原刺激し、培養上清中のインターロイキン (IL)-4 を ELISA にて、また CD4<sup>+</sup>T 細胞の Foxp3 発現をフローサイトメーターにより解析した。

#### (3) 樹状細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞、B 細胞の培養系における菌体成分による濾胞性ヘルパー T 細胞の誘導

BALB/c マウスパイエル板より樹状細胞として CD11c<sup>+</sup> 細胞、脾臓より B 細胞として IgM<sup>+</sup> 細胞、D011.10 TCR トランスジェニックマウス脾臓より CD4<sup>+</sup>T 細胞を精製し、これらを共培養した。OVA 抗原ペプチド、腸内細菌成分のモデルとしての CpG オリゴ DNA、そして食用乳酸菌の加熱死菌体を添加した。濾胞性ヘルパー T 細胞は CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>high</sup> の表現型を示すため、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>high</sup> 細胞を濾胞性ヘルパー T 細胞様細胞とし、CpG、乳酸菌体刺激時の T 細胞中に占めるこの細胞群の割合の変化をフローサイトメトリーを用いて解析した。また、この細胞群の Bcl-6 発現も解析した。さらにこの培養に抗 IL-6 抗体を添加し、影響をみた。一方で、樹状細胞、B 細胞を単独で培養し、CpG オリゴ DNA、乳酸菌体を添加し、培養上清中の IL-6 産生を ELISA にて測定した。

#### (4) 腸管免疫組織の自然リンパ球の腸内細菌刺激に対する応答性の解析

BALB/c マウスよりパイエル板、盲腸リンパ節、結腸リンパ節を摘出し、各リンパ節細胞をマウス腸内細菌分離株の *Bacteroides* 加熱死菌体、*Lactobacillus* 加熱死菌体と共培養した。培養後の細胞についてフローサイトメトリーにより、自然リンパ球中の IL-5 産生細胞割合の解析を行った。自然リンパ球は、細胞系列マーカー分子 (CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD11c, CD19, B220, IgD, IgM, TER-119, Fc RI, Gr-1) を発現せず、CD25 を発現する細胞として規定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 制御性 T 細胞誘導における新規細胞間相互作用の解析

免疫抑制機能を有する制御性 T 細胞は、アレルギーや炎症の抑制効果が期待される。そ

ここで制御性 T 細胞誘導における腸管免疫細胞間相互作用の解析を進めた。

マウス腸間膜リンパ節樹状細胞の制御性 T 細胞誘導能について、CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>high</sup> サブセットの *in vitro* における制御性 T 細胞誘導能が高いことを見出し、さらに詳細に検討した。まず本サブセットの細胞表面分子発現について検討したところ、CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>high</sup> サブセットは、PD-L2、CCR7、XCR1 を発現し、CD172a を発現しなかった。また本サブセットの制御性 T 細胞誘導能は、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体を添加しても影響がなく、制御性 T 細胞誘導にこれらの分子が直接関わらない可能性が示された。一方でこの樹状細胞サブセットは、CCR7 を発現することから移動性の樹状細胞と考えられたが、抗原を経口投与されたマウス由来の CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>high</sup> 樹状細胞は、培養中で経口投与抗原特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖を誘導した。これらの結果から、このサブセットが経口投与抗原を取り込み、腸間膜リンパ節に移動することが示唆された。

経口免疫寛容状態においては、CD62L<sup>high/int</sup>CD44<sup>int</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞の 2 種類の制御性 T 細胞群が誘導されることをこれまでに明らかにしている。これらの細胞について発現遺伝子の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞のケモカインレセプターの発現が高いことが示され、この細胞群が各組織に移動して免疫抑制活性を発揮することが示唆された。

また、卵白食摂取で食物アレルギーを発症する RAG2<sup>-/-</sup>OVA 23-3 マウスについて、本マウス未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞を *in vitro* で様々な濃度で抗原刺激した場合、IL-4 が高産生される一方、Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞がほとんど誘導されなかった。このような CD4<sup>+</sup>T 細胞の性質がアレルギー発症に関わる可能性が示唆された。

## (2) 腸管 IgA 抗体産生における新規細胞間相互作用の解析：乳酸菌による濾胞性ヘルパー T 細胞の誘導促進

腸管の IgA 抗体は、感染防御や腸内共生菌の制御に重要である。この IgA 抗体を増強することにより、感染防御機能の向上が期待できる。一方で、この IgA 抗体産生に重要であることが最近知られるのが、濾胞性ヘルパー T 細胞である。

そこでまず、樹状細胞、T 細胞、B 細胞の相互作用により濾胞性ヘルパー T 細胞誘導を観察できる細胞培養系を作製し、さらに、乳酸菌刺激による濾胞性ヘルパー T 細胞の誘導の促進について検討した。

マウス小腸パイエル板由来樹状細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞、B 細胞の共培養系において、CpG オリゴ DNA 等の微生物由来刺激により、濾胞性ヘルパー T 細胞の表現型を示す細胞の誘導が促進されることを見出した。本培養系にて、CpG オリゴ DNA 存在下、食品として利用される乳

酸菌体を添加すると、濾胞性ヘルパー T 細胞の表現型を示す細胞の誘導が促進され、濾胞性ヘルパー T 細胞に高発現する Bcl-6 の発現も確認された。本培養系における、乳酸菌体の添加による濾胞性ヘルパー T 細胞誘導は、抗 IL-6 抗体の添加により阻害された。一方で、樹状細胞、B 細胞それぞれの単独培養にて、CpG オリゴ DNA 存在下、乳酸菌体を添加すると、IL-6 が産生された。以上の結果から、乳酸菌による濾胞性ヘルパー T 細胞の誘導に、これらの細胞の産生する IL-6 が関わることを示唆された。

## (3) 腸管免疫組織の自然リンパ球の腸内細菌刺激に対する応答性の解析

マウスパイエル板細胞、盲腸リンパ節細胞、結腸リンパ節細胞中で、腸内細菌菌体刺激に対して自然リンパ球が IL-5 を産生することが観察された。これら腸管免疫組織の自然リンパ球が生体内で腸内共生菌に対して IL-5 を産生することが示唆された。

## (4) まとめ

以上、本研究では、免疫抑制機能を有する制御性 T 細胞誘導における腸間膜リンパ節樹状細胞と T 細胞の相互作用、抗体産生に重要な役割を果たす、濾胞性ヘルパー T 細胞誘導における樹状細胞、T 細胞、B 細胞の相互作用に対する食用乳酸菌の作用、また腸管免疫組織自然リンパ球の腸内細菌に対する応答性等に関して、新たな知見を得た。本研究の成果は、腸管免疫系における細胞間相互作用を標的とした新たな免疫機能食品開発に有用と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

A. Shiokawa, R. Kotaki, T. Takano, H. Nakajima-Adachi, S. Hachimura. Mesenteric lymph node CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>high</sup> dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology in press* (Epub ahead of print), 2017, 査読有. DOI: 10.1111/imm.12747.

H. Nakajima-Adachi, K. Shibahara, Y. Fujimura, J. Takeyama, E. Hiraide, A. Kikuchi, H. Murakami, A. Hosono, T. Nochi, Y. Wakatsuki, N. Shimojo, S. Kaminogawa, R. Sato, H. Kiyono, S. Hachimura. Critical role of interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance and inflammation of food allergy. *PLoS ONE* 12, e0172795, 2017, 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0172795.

Y. Sugi, K. Takahashi, K. Kurihara, K.

Nakano, T. Kobayakawa, K. Nakata, M. Tsuda, S. Hanazawa, A. Hosono, S. Kaminogawa.

-Defensin 5 gene expression is regulated by gut microbial metabolites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 242-248, 2017, 査読有. DOI: 10.1080/09168451.2016.1246175.

S. Hachimura. Regulation of allergy by probiotics. *Inflamm. Regen.* 35, 137-139, 2015, 査読有. DOI: 10.2492/inflammregen.35.137.

R. Kotaki, S. Wajima, A. Shiokawa, S. Hachimura. Toll-like receptor 2 suppresses Toll-like receptor 9 responses in Peyer's patch dendritic cells. *Immunobiology* 220, 734-43, 2015, 査読有. DOI: 10.1016/j.imbio.201.12.022.

八村敏志. 腸管免疫と老化. 医学のあゆみ, 253, 729-731, 2015, 査読無.

八村敏志. 腸の機能と食品の作用. 臨床栄養, 126, 116-120, 2015, 査読無.

八村敏志. 腸管関連リンパ組織におけるストローマ細胞の役割. 臨床免疫・アレルギー科, 62, 14-16, 2014, 査読無.

八村敏志. 腸内細菌の認識と免疫・アレルギー. *G. I. Research*, 22, 136-140, 2014, 査読無.

八村敏志. 腸管免疫 腸内フローラと免疫系の接点. 生物の科学 遺伝, 68, 328-331, 2014, 査読無.

八村敏志. 腸管免疫系に特徴的な細胞群による免疫応答誘導の腸内共生菌と食品の作用. *化学と生物*, 52, 814-818, 2014, 査読無.

[学会発表](計34件)

高野 智弘ら. 腸間膜リンパ節樹状細胞およびT細胞のレチノイン酸に関わる応答の加齢による変化. 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月19日, 京都女子大学(京都・京都市).

畑井俊哉ら, 大腸リンパ節特徴的に存在する自然リンパ球の解析. 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月19日, 京都女子大学(京都・京都市).

畑井俊哉ら. 腸管関連リンパ組織 (GALT)

における自然リンパ球 (ILCs) 応答性の組織特異性解析: 大腸・小腸免疫系の比較. 日本食品免疫学会2016年度大会, 2016年11月9日, 東京大学(東京・文京区).

糸賀翔大ら. 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849による濾胞性ヘルパーT細胞誘導機構の解析. 第20回腸内細菌学会, 2016年6月10日. 東京大学(東京・文京区).

芝原 恭子ら. 経口免疫寛容において誘導される CD62L<sup>high/int</sup>CD44<sup>int</sup> および CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> T細胞の遺伝子発現・機能解析. 日本農芸化学会2016年度大会, 2016年3月30日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

糸賀翔大ら. 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849による濾胞性ヘルパーT細胞誘導機構の *in vitro* 解析. 日本農芸化学会2016年度大会, 2016年3月30日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

KOTAKI Ryutaro ら. Mesenteric lymph node CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> dendritic cells highly induce Foxp3<sup>+</sup> T cells. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月20日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

SHIBAHARA Kyoko ら. Functional differences in two different antigen specific T cell subsets induced in oral tolerance. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月19日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

高野智弘ら. 腸間膜リンパ節樹状細胞における RALDH2 発現のサブセット間比較および加齢による影響. 日本食品免疫学会2015年度大会, 2015年10月15日, 東京大学(東京・文京区).

Satoshi Hachimura. The intestinal immune system from the viewpoint of food allergy. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, 2015年5月17日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜市).

上滝隆太郎ら. 腸間膜リンパ節 CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> 樹状細胞は遊走性サブセットの特徴を有し、腸管指向性制御性 T 細胞を高く誘導する. 日本農芸化学会2015年度大会. 2015年3月27日, 岡山大学(岡山・岡山市).

KOTAKI Ryutaro ら. Dendritic cells in

mesenteric lymph nodes are divided into four subsets based on CD11b, CD103 and PD-L1 expression. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月10日, 国立京都国際会館(京都・京都市).

芝原恭子ら. 経口免疫寛容においてCD62LとCD44の発現で規定されるT細胞群の分布と挙動解析. 日本食品免疫学会2014年度大会, 2014年10月16日, 東京大学(東京・文京区).

八村敏志. 腸管免疫特有の細胞と食品による免疫制御. 日本食品免疫学会2014年度大会, 2014年10月16日, 東京大学(東京・文京区).

上滝隆太郎ら. 腸間膜リンパ節CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>樹状細胞は高い制御性T細胞誘導能を有し腸内細菌の影響を受ける. 第18回腸内細菌学会, 2014年6月11日, 東京大学(東京・文京区).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA, Satoshi)  
東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 40238019

### (2) 研究分担者

細野 朗 (HOSONO, Akira)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 70328706

高橋 宜聖 (TAKAHASHI, Yoshimasa)  
国立感染症研究所・免疫部・室長  
研究者番号: 60311403

### (3) 研究協力者

足立 はるよ (ADACHI, Haruyo)  
東京大学・農学生命科学研究科・特任助教  
研究者番号: 20595962